

令和元年6月19日現在

機関番号：32206

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K21647

研究課題名（和文）BCRシグナルとTNFAIP3/A20遺伝子変異の関係

研究課題名（英文）The relationship BCR signaling pathway and functional variants of TNFAIP3/A20

研究代表者

野本 順子（Nomoto, Junko）

国際医療福祉大学・医学部・助手

研究者番号：30601322

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：ABCタイプのびまん性大細胞型B細胞リンパ腫（ABC-DLBCL）を対象に、NF- κ Bシグナル経路を含むBCRシグナル経路の遺伝子について、ターゲットシーケンス解析を行った。その結果、ABC-DLBCLは、BTK阻害剤が作用するBTKより下流のCARD11および、さらに下流のTNFAIP3/A20をはじめとするNF- κ Bシグナル経路の遺伝子にも変異が認められたことから、BTKより下流に遺伝子変異がある場合、BTK阻害剤による治療が有用でない例が存在する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ABC-DLBCLの治療効果に関与する因子が同定され、それらが診断・治療選択・予後予測に有用であることを明らかにすることは、ABC-DLBCLのみならず、B細胞性リンパ腫の新たな治療標的や治療法の開発、および診断や病型分類といった個別化医療の基盤となることが期待される。

研究成果の概要（英文）：We performed target sequence analysis of ABC-type diffuse large-cell B-cell lymphoma (ABC-DLBCL). The genes of BCR signaling pathway downstream of BTK including NF- κ B signaling pathway were analyzed. We found genes downstream from BTK, such as CARD11, and more downstream genes of NF- κ B signaling pathway including TNFAIP3/A20 were mutated. These result suggested that the treatment of ABC-DLBCL by BTK inhibitor is not universally effective, especially in cases with mutated genes downstream of BTK.

研究分野：遺伝子検査学、ゲノム医学、造血器腫瘍

キーワード：TNFAIP3/A20 BCRシグナル経路 ターゲットシーケンス ABC-DLBCL

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

NF- κ B は炎症反応や免疫反応において中心的な役割を果たしており、悪性リンパ腫では恒常的な活性化が起きている。近年、B 細胞リンパ腫では、B 細胞の生存に重要な BCR シグナル経路の活性化とそれに続く NF- κ B シグナル経路の活性化が腫瘍の発症、増殖に重要なことが明らかとなってきた。BCR および NF- κ B シグナル経路の活性化の原因としてこれまでに複数の遺伝子変異が報告されている。

悪性リンパ腫では、化学療法により治癒が望める疾患が多いことから、rituximab をはじめとする分子標的薬の開発が進んでおり、近年、BCR シグナル経路を標的とした阻害剤の開発が進められている。その一つであるブルトン型チロシンキナーゼ (Burton's Tyrosine Kinase; BTK) 阻害剤 ibrutinib は多くの B 細胞リンパ腫での治療効果が認められている。しかし、BTK よりも下流に位置する MYD88 や CARD11 遺伝子に異常がある Activated B-cell-like (ABC)-type びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫 (Diffuse large B-cell lymphoma; DLBCL) (ABC-DLBCL) では治療効果がみられないことがわかってきた (Wilson et al. Blood, 2012, 120:686)。また、in vitro の実験からも CARD11 に変異があった場合に治療効果がみられないという報告がなされた (Mark et al. Nature, 2014, 11:p12-23)。このことは BCR シグナル経路を抑制してもより下流の因子に遺伝子の変異があると NF- κ B の活性が維持され細胞生存につながることを示唆しており、A20 を含む他の BCR および NF- κ B シグナル経路の因子に遺伝子変異がある場合にも同様に BTK 阻害剤の治療効果に影響を及ぼすことが考えられた。

2. 研究の目的

本研究では、ABC-DLBCL において A20 変異を含む BCR および NF- κ B シグナル経路における遺伝子変異の種類、頻度を明らかとし、それらの遺伝子変異が BTK 阻害剤の有効性に与える影響を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) ABC-DLBCL 検体の収集と、核酸抽出

2003 年から 2017 年までに国立がん研究センター中央病院で ABC-DLBCL と診断された患者を対象とした。

臨床検体の収集：検体は、ホルマリン固定パラフィン包埋標本 (Formalin-Fixed Paraffin-Embedded; FFPE)、凍結組織、および血液・骨髄を用いた。臨床情報は診療録より匿名化した上で収集した。

DNA の抽出と精度管理：DNA 抽出には QIAGEN 社の QIAamp DNA FFPE Tissue Kit および QIAamp QIAamp DNA Mini Kit を用いた。DNA の質によるシーケンス解析での誤差を回避するため、DNA の精度は、吸光度計・dsDNA の蛍光度測定・定量 PCR 法を用いて精密に検証し、一定純度以上のものを使用した。

(2) 次世代シーケンス解析

BCR および NF- κ B シグナル経路に関係する因子から ABC-DLBCL の疾患特異的な変異遺伝子を同定するため、次世代シーケンス解析を行った。

次世代シーケンサーによるターゲットシーケンス：ターゲットシーケンス用には NF- κ B シグナル経路の遺伝子および B 細胞リンパ腫で変異の認められている遺伝子を個選択し作製した。シーケンシングには Life technology 社の Ion Torrent PGM システムを使用した。

変異遺伝子の抽出：QIAGEN 社の CLC Genomics Workbench および、Life technology 社の Ion Torrent サーバーを用いてシーケンスデータ解析を行い、変異遺伝子を抽出した。

(3) 治療関連変異遺伝子の同定

シーケンスデータ解析により抽出された候補遺伝子が、ABC-DLBCL の臨床症状、予後などに関連した疾患特異的なものであるかを同定するため、遺伝統計学的解析を行った。

変異遺伝子の統計解析：各患者の臨床背景因子を用いて疾患関連変異の同定と疾患関連解析による頻度の算出を行い、ABC-DLBCL における疾患関連遺伝子変異としての有用性を検討した。

A20 との連関の検討：A20 と候補遺伝子が単独で存在する場合と共存する場合で関連解析を行い、両者の疾患特異的な連関を統計的に算出した。

4. 研究成果

ABC-DLBC 患者 68 例の FFPE 検体あるいは凍結組織検体から腫瘍細胞 DNA を抽出した。これらのうち、包括同意によって末梢血検体を得られている 35 例については、正常細胞 DNA を抽出した。また、再発性の ABC-DLBC 患者で、初発時腫瘍細胞、再発時腫瘍細胞、正常細胞が得られた 15 例についても FFPE 検体および DNA 検体から各 DNA を抽出した。

全 83 症例 148 DNA サンプルについて、ターゲットシーケンスのためのアンプリコンライブラリーを作製し、シーケンス解析を行った。シーケンスパネルは、A20、BTK、MYD88、CARD11 といった NF- B シグナル経路を中心とした BCR シグナル経路に関連する遺伝子から 64 遺伝子を選択し、これらの全エクソンについてプライマー設計した。サーモフィッシャー

製 Ion Torrent Proton システムを用いたシーケンスでは、1 ラン当りのリード数は約 106 M で、1 検体当りのリード数は平均 4.2 M だった。各サンプルについて、CLC Genomics Workbench ソフトウェアおよび Ion Torrent サーバーを使用して体細胞変異を検出した。正常サンプルには、我々が保有する正常サンプルのプールデータを用いた。また、同一患者由来の腫瘍・正常ペアがある検体については、個々にも解析を行った。再発性の検体では、経時的な遺伝子変異の変化についても検討した。

その結果、BTK 下流の CARD11 以外にも、さらに下流にある A20 を含む NF- κ B シグナル経路に関係する遺伝子に変異を検出し、複数の体細胞変異を持つ症例が多数認められた。また、再発性の症例においては、特定の遺伝子変異を持つ集団が認められた。特定の遺伝子変異は明らかではないが、体細胞変異の数や種類が、多くの症例で ABC-DLBC の病態を反映していたことから、BTK より下流の NF- κ B シグナル経路に関連する複数の遺伝子変異の蓄積が BTK 阻害剤の効果に影響し、ABC-DLBC において治療効果が認められない可能性が示唆された。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 9 件)

Toyoda K, Maeshima AM, Nomoto J, Suzuki T, Yuda S, Yamauchi N, Taniguchi H, Makita S, Fukuhara S, Munakata W, Maruyama D, Tobinai K, Kobayashi Y. Mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma with t(11;18)(q21;q21) translocation: long-term follow-up results. *Ann Hematol*. 2019 Mar 28.

Sekiguchi N, Nomoto J, Nagata A, Kiyota M, Fukuda I, Yamada K, Takezako N, Kobayashi Y. Gene Expression Profile Signature of Aggressive Waldenstrom Macroglobulinemia with Chromosome 6q Deletion. *Biomed Res Int*. 2018 Oct 4;2018:6728128.

Tanaka Y, Maeshima AM, Nomoto J, Makita S, Fukuhara S, Munakata W, Maruyama D, Tobinai K, Kobayashi Y. Expression pattern of PD-L1 and PD-L2 in classical Hodgkin lymphoma, primary mediastinal large B-cell lymphoma, and gray zone lymphoma. *Eur J Haematol*. 2018 May;100(5):511-517.

Kawashima I, Inamoto Y, Maeshima AM, Nomoto J, Tajima K, Honda T, Shichijo T, Kawajiri A, Takemura T, Onishi A, Ito A, Tanaka T, Fuji S, Kurosawa S, Kim SW, Maruyama D, Tobinai K, Kobayashi Y, Fukuda T. Double-Expressor Lymphoma Is Associated with Poor Outcomes after Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2018 Feb;24(2):294-300.

Fukuhara S, Nomoto J, Kim SW, Taniguchi H, Miyagi Maeshima A, Tobinai K, Kobayashi Y. Partial deletion of the ALK gene in ALK-positive anaplastic large cell lymphoma. *Hematol Oncol*. 2018 Feb;36(1):150-158.

Miyamoto K, Kobayashi Y, Maeshima AM, Taniguchi H, Nomoto J, Kitahara H, Fukuhara S, Munakata W, Maruyama D, Tobinai K. Clinicopathological prognostic factors of 24 patients with B-cell lymphoma, unclassifiable, with features intermediate between diffuse large B-cell lymphoma and Burkitt lymphoma. *Int J Hematol*. 2016 Jun;103(6):693-702.

Ueda R, Maruyama D, Nomoto J, Maeshima AM, Fukuhara S, Kitahara H, Miyamoto K, Munakata W, Suzuki T, Taniguchi H, Kobayashi Y, Tobinai K. FUS-ERG gene fusion in isolated myeloid sarcoma showing uncommon clinical features. *Oxf Med Case Reports*. 2016 Jan 13;2016(1):4-8.

Maeshima AM, Taniguchi H, Nomoto J, Makita S, Kitahara H, Fukuhara S, Munakata W, Suzuki T, Maruyama D, Kobayashi Y, Tobinai K. Clinicopathological features of classical Hodgkin lymphoma in patients \geq 40 years old, with special reference to composite cases. *Jpn J Clin Oncol*. 2015 Oct;45(10):921-8.

Tanaka Y, Kobayashi Y, Maeshima AM, Oh SY, Nomoto J, Fukuhara S, Kitahara H, Munakata W, Suzuki T, Maruyama D, Tobinai K. Intravascular large B-cell lymphoma secondary to lymphoplasmacytic lymphoma: a case report and review of literature with clonality analysis. *Int J Clin Exp Pathol*. 2015 Mar 1;8(3):3339-43.

〔学会発表〕(計 1 件)

Tomotaka Suzuki, Suguru Fukuhara, Junko Nomoto, Satoshi Yamashita, Akiko Miyagi Maeshima, Yuta Ito, Shunsuke Hatta, Sayako Yuda, Shinichi Makita, Wataru Munakata, Tatsuya Suzuki, Dai Maruyama, Hirokazu Taniguchi, Toshikazu Ushijima, Koji Izutsu, Kensei Tobinai, and Yukio Kobayashi, MD. Genomics of Limited-Stage Diffuse Large B-Cell Lymphoma Developing Late Relapse: Analysis of Gene Alterations in Paired Primary and Late Relapsed Tumors By Target Sequencing. 60th American Society of Hematology Annual Meeting & Exposition. 2018

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

○取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究分担者

(2)研究協力者

研究協力者氏名：小林 幸夫

ローマ字氏名：Yukio Kobayashi

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。